昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2006，49(3)：381－386 ISSN 0454-6296

转基因杨树对杨小舟蛾体内三种保护酶活力的影响

郭同斌[1]，嵇保中[2]，蒋继宏[3]，杜　伟[1]，诸葛强[2]，黄敏仁[2]

(1. 徐州市森林病虫防治检疫站，江苏徐州　221004；2. 南京林业大学森林资源与环境学院，南京　210037；
3. 徐州师范大学，江苏省药用植物生物技术重点实验室，江苏徐州　221116)

摘要：用转 *Bt* 单基因(FB56)和转 *Bt* + *CpTI* 双价基因(D18)杨树叶片饲喂杨小舟蛾 *Micromelalopha troglodyta* (Graeser)，采用酶活力测定方法研究了转基因杨树对幼虫中肠和血淋巴三种保护酶(SOD、CAT 和 POD)活力的影响。结果表明，幼虫中肠 SOD 活力显著升高，而 CAT 和 POD 活力受到了显著抑制。用 FB56 处理 24 h，杨小舟蛾幼虫中肠 SOD 活力增加了 41.7%，与对照有显著差异；而用 D18 处理，SOD 活力增加了 25.3%，与对照差异不显著。用 FB56 处理 24 h，中肠 CAT 活力受到显著抑制，36 h 后抑制能力不强；而用 D18 处理，CAT 活力全程受到显著抑制。用 FB56 和 D18 处理 36 h，中肠 POD 活力均受到显著抑制，分别比对照下降 70.1%和 89.8%。转基因杨树通过扰乱幼虫中肠 SOD、CAT 和 POD 三种保护酶的动态平衡，使虫体内自由基清除遇到了障碍，从而对其产生了毒害作用。转双价基因杨树对幼虫中肠保护酶的毒害作用大于转单基因杨树。用 2 种转基因杨树叶片饲喂杨小舟蛾幼虫后其血淋巴 SOD 和 POD 活力均没有受到显著影响，但 CAT 活力均显著高于对照，转基因杨树对血淋巴保护酶系统的影响小于对中肠保护酶系统的影响。

关键词：转基因杨树；杨小舟蛾；保护酶；SOD；CAT；POD

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2006)03-0381-06

Effect of transgenic poplars on the activities of three protective enzymes in *Micromelalopha troglodyta* (Graeser) (Lepidoptera：Notodontidae)

GUO Tong-Bin[1]，JI Bao-Zhong[2]，JIANG Ji-Hong[3]，DU Wei[1]，ZHUGE Qiang[2]，HUANG Min-Ren[2] (1. Forest Pest Management and Quarantine Station of Xuzhou City，Xuzhou，Jiangsu 221004，China；2. College of Forest Resources and Environment，Nanjing Forestry University，Nanjing 210037，China；3. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province，Xuzhou Normal University，Xuzhou，Jiangsu 221116，China)

Abstract：Effect of transgenic poplars on the activities of three protective enzymes (SOD，CAT and POD) in the midgut and haemolymph of *Micromelalopha troglodyta* (Graeser) larvae fed with leaves of transgenic poplars expressing *Bt* gene only (FB56) and expressing *Bt* and *CpTI* genes (D18) was studied in the laboratory using enzyme activities determination. The results showed that the SOD activity in the midgut of the larvae was raised significantly，while the CAT and POD activities were controlled significantly. When the larvae were fed with the leaves of FB56 for 24 hours，the activity of SOD in the midgut of the larvae was raised by 41.7%，which had significant differences with CK. But SOD activity was raised by 25.3% after treating with D18，which had no significant difference with CK. After 24 hours feeding on FB56，the activity of CAT in the midgut of the larvae was restrained significantly，but the restraining ability was not strong after 36 hours. But CAT activity was controlled significantly after treating with D18. FB56 and D18 all restrained the activity of POD in the midgut of the larvae greatly after 36 hours treatment，and the activity decreased by 70.1% and 89.8% respectively. Thus，the transgenic poplars could delay the cleaning of free radicals in the body of *M*.

基金项目：国家研究与开发专项项目(JY03-B-25)；江苏省高新技术资助项目(BG2001313，BG2003306)

作者简介：郭同斌，男，1967 年 4 月生，高级工程师，博士，主要从事林业有害生物防治技术研究，E-mail：gtb1101@163.com

收稿日期 Received：2005-08-17；**接受日期** Accepted：2005-11-25

troglodyta，and disturb the dynamic balance of SOD，CAT and POD in the midgut of the larvae，which was the one of acting mechanisms. The harm of the transgenic poplars expressing both *Bt* and *CpTI* to the larvae is stronger than transgenic poplars expressing *Bt* alone. The activities of SOD and POD in the haemolymph of the larvae had no significant difference with CK after treating with leaves of two kinds of transgenic poplars，but the activity of CAT had a significant increase compared with CK. Thus，the influence of transgenic poplars on the endogenous protective enzymes in the haemolymph was smaller than that in the midgut.

Key words：Transgenic poplars；*Micromelalopha troglodyta*；protective enzymes；SOD；CAT；POD

生物在生命活动过程中，特别是在逆境条件下会产生多种氧自由基，如超氧阴离子自由基（$O_2^{\cdot -}$）、单线态氧（$^1O_2$）、过氧化氢（H_2O_2）和羟自由基（HO·）等。这些自由基具有很强的氧化能力，对许多生物功能分子具有破坏作用，但在正常情况下生物体内自由基的产生与清除在超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化氢酶（catalase，CAT）和过氧化物酶（peroxidase，POD）三种酶协调作用下，处于一种动态平衡状态，使自由基维持在一个低水平，从而防止自由基毒害（李周直等，1994；Peric-Mataruga *et al.*，1997；Wang *et al.*，2001a，2001b）。因此，Fridovich（1977）把这三种酶统称为保护酶系统。昆虫保护酶系统活性与杀虫剂、昆虫病毒、微孢子虫等外界刺激物的强度，昆虫耐药性和抗逆性等相关（李周直等，1994；Wang *et al.*，2001b；蒋志胜等，2003；Lozinskaya *et al.*，2004），转基因植物所表达的杀虫蛋白与这些外界刺激物一样，也能引起昆虫体内保护酶活性的变化。Ding 等（2001）分别测定了转 *Bt* 基因欧洲黑杨 *Populus nigra* 和转 *CpTI* 基因毛白杨（*P. tomentosa* × *P. bolleana*）× *P. tomentosa* 对美国白蛾 *Hyphantria cunea* 幼虫中肠 SOD、CAT 和 POD 活性的影响，结果表明害虫取食转基因杨树后，中肠 SOD、CAT 和 POD 三种保护酶活力在饲喂数小时内均逐渐增加，某一时刻达到最高值后突然下降。

杨树 NL-80106 是南京林业大学从美洲黑杨 × 小叶杨（*P. deltoides* × *P. simonii*）F_1 代中选育出的优良无性系，在黄淮地区广泛种植，具有生根力强、造林成活率高、生长快等优良性状。郭同斌等（2004）研究证实转 *Bt* 基因杨树 NL-80106 对杨小舟蛾 *Micromelalopha troglodyta*（Graeser）具有显著的杀虫活性，但对此虫体内保护酶的影响还未见报道。对 Bt 伴孢晶体蛋白和从豇豆中分离的 CpTI 等的杀虫机理已进行了较为详尽的研究，但它们与转基因植物所表达的 Bt 蛋白或 CpTI 的杀虫机理可能在毒蛋白的数量和组分上存在差异。因此，弄清转基因杨树叶片中微量杀虫蛋白被害虫取食后对其体内酶系统产生的变化，对揭示转基因杨树的杀虫机理和开展害虫对转基因杨树产生的抗性治理等具有重要意义。杨小舟蛾是我国杨树人工林的主要食叶害虫，近年来常猖獗成灾，严重制约了杨树产业的发展。为探明转基因杨树对杨小舟蛾幼虫生理生化的影响，作者以转 *Bt* 单基因和转 *Bt* + *CpTI* 双价基因杨树 NL-80106 的大田移植植株为材料，系统测定了杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树叶片后，其中肠和血淋巴 SOD、CAT、POD 三种保护酶活性的变化，为转基因杨树在防治中应用及其抗性治理提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试杨树品种及虫源

杨树 NL-80106 的转 *Bt* 单基因无性系 FB56 和转 *Bt* + *CpTI* 双价基因无性系 D18 及对照杨树 NL-80106 均由南京林业大学林木遗传和基因工程实验室提供，并于 2002 年春季定植于徐州市林业站苗圃，定植密度每公顷 3 万株。2004 年 3 月底前从远离种植转基因杨树苗圃的杨树林内采集杨小舟蛾越冬蛹，置于室内套笼的花盆内，羽化后挑选健康雌、雄成虫配对，放于长 120 cm、宽 50 cm、高 30 cm 的玻璃缸（缸内分隔为 8 个小室，每室放 1 对雌雄成虫）内让其交配。将交配结束的雌、雄成虫放于倒置的直径为 8 cm 的培养皿内，皿内铺以白纸让其产卵。将近孵化的卵块用双面胶带贴于对照杨树叶片背面，置于倒置在饲养架上的 100 mL 三角烧瓶内（幼虫有向上爬行习性，因而不会逃脱）。养虫室室温 25～28℃，光周期 14L∶10D。孵化后的初龄幼虫自行取食对照杨树苗叶片，每 2 天更换 1 次新鲜叶片，饲喂至 3 龄作为实验虫源。

1.2 转基因杨树饲喂杨小舟蛾处理

采集 FB56、D18 的大田移植植株顶部第 3、4 片展开叶，清水冲洗晾干后放入三角烧瓶内，每瓶放叶片 1 张。取个体大小一致、刚蜕皮的杨小舟蛾 3 龄幼虫，饥饿 2 h 后每瓶接幼虫 5 头。接虫后将三角

烧瓶倒置于饲养架上，饲喂至4、12、24、36和48 h后解剖取样。对照用NL-80106的叶片饲养至相应的时间后解剖取样。

1.3　杨小舟蛾幼虫中肠酶源制备

每个处理取10头幼虫作为提取中肠的虫源。将10头幼虫置于预冷的蜡盘上截取中肠，置于-20℃冰箱中冰冻贮存。测定前取出稍融后，置于预冷的玻璃匀浆器中，加入4.0 mL 0.02 mol/L磷酸盐缓冲液（pH 7.0，含1%的聚乙烯吡咯烷酮）在冰浴中匀浆，匀浆液用GL-160G-Ⅱ型高速冷冻离心机（上海安亭仪器厂）0℃，10 000 r/min离心20 min，取上清液作为酶源。每处理5次重复。

1.4　杨小舟蛾幼虫血淋巴酶源制备

每个处理取10头幼虫作为提取血淋巴的虫源。在冰盘上用眼科剪小心剪破供试昆虫的腹足，用微量毛细吸管从每头幼虫体内吸取5 μL，10头幼虫共50 μL血淋巴，置于盛有2 mL 0.02 mol/L磷酸盐缓冲液（含少量苯基硫脲，防止血液氧化）的塑料离心管中，混匀后用GL-160G-Ⅱ型高速冷冻离心机0℃，10 000 r/min离心20 min，取上清液作为酶源。每处理3次重复。

1.5　杨小舟蛾幼虫体内3种保护酶活力的测定

1.5.1　SOD活性：按略改进的Beauchamp和Fridovich（1971）方法测定。酶标板反应孔300 μL反应液中含50 mmol/L磷酸盐缓冲液（pH 7.0），13 mmol/L蛋氨酸，75 μmol/L氮蓝四唑（NBT），0.1 mmol/L乙二胺四乙酸（EDTA）和10 μL酶液，最后加4 μmol/L核黄素。置于4 000 lx日光下进行光化学反应，反应温度25℃，15 min，然后用黑暗终止反应，立即在550 nm下比色。一个酶活力单位为相当于引起300 μL反应液达到50%抑制所需的酶量。

1.5.2　CAT活性：按略改进的程鲁京和孟泽（1994）方法测定。在最佳酶反应条件下，酶促反应后剩余的H_2O_2与钼酸铵形成稳定的黄色复合物，其颜色深浅与酶活性成反比。在酶标板的空白孔B_1中加入预温的100 μL基液（65 μmol/mL H_2O_2），100 μL钼酸铵，20 μL酶液。空白孔B_2中加入100 μL基液，100 μL钼酸铵，20 μL pH 7.4磷酸盐缓冲液。测定孔U加入20 μL酶液，100 μL基液，37℃准确保温60 s后，立即加入100 μL钼酸铵摇匀，排气泡，用BIO-RAD Model 550型酶标仪测定405 nm下的光密度值。在本测定条件下每分钟分解1 μmol过氧化氢为一个酶活力单位。

1.5.3　POD活性：按略改进的Simon等（1974）方法测定。酶标板反应孔300 μL反应液中含100 mmol/L磷酸盐缓冲液（pH 6.0），30 mmol/L愈伤木酚，26 mmol/L H_2O_2。饲喂转基因及对照杨树叶片时间处理为4、12、24 h的中肠酶源加样量为20 μL，36、48 h为5 μL；血淋巴酶源的加样量，5个时间处理均为50 μL。作用5 min后用BIO-RAD Model 550型酶标仪测定470 nm下的光密度值。酶活力单位以每毫克蛋白每分钟在470 nm下的OD值表示。

1.6　酶源蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝G-250染色法（王淳本，2003）测定各处理的酶源蛋白质含量。

1.7　数据处理

对上述相同饲喂时间测定的酶活力指标，采用SAS统计软件多重比较重复*t*检验法检验不同转基因杨树叶片处理的平均酶活力与对照叶片处理的平均酶活力差异的显著性（高惠旋等，1995）。

2　结果与分析

2.1　杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树后中肠保护酶活性的变化

用FB56、D18和NL-80106杨树叶片饲喂杨小舟蛾幼虫不同时间后测定其中肠SOD、CAT和POD活性，结果见表1。

2.1.1　对SOD活性的影响：杨小舟蛾幼虫取食转基因和对照杨树4～12 h，其中肠SOD活性均呈下降趋势，此后趋于平缓，36 h后又呈下降趋势。用2种转基因杨树饲喂4 h，处理组SOD活力均高于对照组，但差异不显著；饲喂12 h，处理组显著高于对照组；36 h后处理组与对照组无显著差异。用FB56处理杨小舟蛾幼虫12、24 h，SOD平均活力分别比对照平均活力增加了34.5%和41.7%，与对照均有显著差异（$P<0.05$）；用D18处理12、24 h，SOD平均活力分别比对照增加了37.0%和25.3%，增加幅度小于FB56，其中处理12 h，SOD活力与对照差异显著（$P<0.05$），而处理24 h，与对照差异不显著（表1）。由此可见，杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树后，中肠SOD活性显著上升，以适应摄入的外源有毒杀虫蛋白的影响。用转双价基因杨树处理，SOD活性增加幅度小于转单基因杨树，暗示转双价基因杨树比转单基因杨树更能抑制SOD活力的增长，更能抑制SOD清除超氧阴离子自由基（$O_2^{\cdot -}$）的能力，从而对害虫产生的毒害作用大于转单基因杨树。

2.1.2　对CAT活性的影响：杨小舟蛾幼虫取食转

基因和对照杨树 4～12 h，其中肠 CAT 活性均呈缓慢下降趋势，此后趋于平缓。用 2 种转基因杨树饲喂 4～12 h，处理组 CAT 活力与对照无显著差异，表明 CAT 活力在取食初期未受到显著影响，但饲喂 24～48 h 的 CAT 活力变化与所饲喂的转基因杨树无性系有关。用 FB56 处理杨小舟蛾幼虫 24 h，CAT 平均活力较对照下降了 16.3%，与对照存在显著差异（$P<0.05$），36 h 较对照下降了 2.6%，与对照无显著差异，48 h 又极显著高于对照（$P<0.01$）；用 D18 处理，CAT 活力全程受到抑制，均低于用对照杨树处理的 CAT 活力。其中处理 24 和 36 h，CAT 平均活力分别比对照下降 21.5% 和 9.9%，分别与对照存在极显著（$P<0.01$）和显著差异（$P<0.05$）（表 1）。由此可见，幼虫取食转单基因杨树后，其中肠 CAT 活性逐渐受到抑制，饲喂 24 h 达到抑制高峰，但 36 h 后抑制能力不强；而用转双价基因杨树处理，CAT 活力在饲喂 24 和 36 h 后均受到显著或极显著抑制，抑制能力优于转单基因杨树。

2.1.3 对 POD 活性的影响：杨小舟蛾幼虫取食转基因和对照杨树后，其中肠 POD 活性变化均表现为相似的规律：前 24 h 变化平缓，后 24 h 急剧上升，而且用转基因杨树处理后，POD 活性全程受抑制，与对照均存在显著差异。用 FB56 处理 12～48 h，POD 平均活力与对照均存在极显著的差异，其中 12、36 和 48 h 的差异显著性达 $P<0.001$，处理 24、36 和 48 h，POD 活力分别较对照下降了 51.4%、70.1% 和 54.9%；用 D18 处理 4 h，POD 活力与对照存在显著差异（$P<0.05$），处理 12～48 h，POD 活力与对照均存在极显著差异，其中 12、36 h 的差异显著性达 $P<0.001$，处理 24、36 和 48 h，POD 活力分别比对照下降了 54.1%、89.9% 和 25.5%（表 1）。因此，用 2 种转基因杨树处理后，中肠 POD 活力均受到了显著抑制，处理 12 h，达到抑制高峰，处理 36 h，POD 活力均较对照下降 70% 以上，其中 D18 下降幅度最大（89.9%）。

表 1 杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树后中肠 SOD、CAT 和 POD 活性的变化

Table 1 The influence of transgenic poplars on the activity of SOD, CAT and POD in the midgut of *Micromelalopha troglodyta* larvae

取食时间 Feeding time (h)	SOD 活性 SOD activity (Unit·mg^{-1}·min^{-1})			CAT 活性 CAT activity (mmol·mg^{-1}·min^{-1})			POD 活性 POD activity (OD$_{470}$·mg^{-1}·min^{-1})		
	CK	FB56	D18	CK	FB56	D18	CK	FB56	D18
4	4.438 ± 1.387	4.966 ± 0.825	4.648 ± 0.649	0.591 ± 0.157	0.603 ± 0.199	0.532 ± 0.077	1.746 ± 1.984	0.995 ± 0.383	0.622 ± 0.055*
12	1.899 ± 0.713	2.555 ± 1.128*	2.601 ± 0.415*	0.401 ± 0.130	0.449 ± 0.175	0.357 ± 0.062	4.045 ± 2.299	0.621 ± 0.401***	1.786 ± 1.075***
24	2.083 ± 0.910	2.952 ± 0.729*	2.611 ± 1.008	0.484 ± 0.110	0.405 ± 0.083*	0.380 ± 0.058**	2.534 ± 1.353	1.231 ± 0.900**	1.163 ± 1.105**
36	3.250 ± 0.617	3.244 ± 0.600	3.518 ± 0.597	0.503 ± 0.027	0.490 ± 0.035	0.453 ± 0.089*	30.455 ± 7.227	9.105 ± 5.452***	3.063 ± 2.505***
48	2.099 ± 0.390	2.412 ± 0.560	1.934 ± 0.735	0.376 ± 0.042	0.416 ± 0.024**	0.360 ± 0.034	63.620 ± 19.192	28.719 ± 8.494***	47.420 ± 11.499**

注：同一时间测定的不同转基因杨树叶片饲喂幼虫的平均酶活力同对照幼虫平均酶活力进行多重比较重复 t 检验，* 表示差异显著性水平 $P<0.05$，** 表示 $P<0.01$，*** 表示 $P<0.001$。表 2 同。

Notes: The difference of the enzyme activity between transgenic poplars and control poplars was tested by SAS software, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. The same for Table 2.

2.2 杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树后血淋巴保护酶活性的变化

用 FB56、D18 及 NL-80106 杨树叶片饲喂杨小舟蛾幼虫不同时间后测定其血淋巴 SOD、CAT 和 POD 活性，结果见表 2。

2.2.1 对 SOD 活性的影响：杨小舟蛾幼虫取食转基因和对照杨树后，血淋巴 SOD 活性变化规律为：前 24 h 内变化平缓，24～36 h 活性上升，随后逐渐下降。前 24 h 内，用转基因杨树处理，血淋巴 SOD 平均活力低于对照，其中用 D18 处理 12 h，SOD 活力与对照有极显著差异（$P<0.01$）。处理 24 h 后，SOD 活性开始升高，处理 36 h，活性高于对照，但差异不显著。用 FB56 处理 48 h，SOD 活力比对照增加了 75.2%，与对照差异显著（$P<0.001$），用 D18 处理 48 h，SOD 活力比对照增加了 102.0%，与对照差异显著（$P<0.01$）（表 2）。因此用 2 种转基因杨树处理，幼虫血淋巴 SOD 活力前期受到抑制，其中用转双价基因杨树处理 12 h 的 SOD 活力受到显著抑制。但抑制能力不强，后期（36～48 h）SOD 活力显著升高，表明转基因杨树对血淋巴 SOD 活力的抑制作用不显著。

2.2.2 对 CAT 活性的影响：用转基因杨树和对照杨树饲喂杨小舟蛾幼虫后，其血淋巴 CAT 活性变化均表现为相似的规律：处理组幼虫 CAT 活性大大高于对照组幼虫，表明活性上升。用 FB56 处理，CAT 平均活力全程高于对照组幼虫的 CAT 活性，其中处

理 12、36 h，CAT 活性与对照组有显著差异（$P < 0.05$），处理 24、48 h，CAT 活力与对照组存在极显著差异（$P < 0.01$ 或 $P < 0.001$）；用 D18 处理 12 h，处理组与对照组幼虫 CAT 活力存在显著差异（$P < 0.05$），处理 24、48 h，CAT 活力均极显著高于对照，其中处理 48 h 的差异显著性达 $P < 0.001$（表 2）。因此，杨小舟蛾幼虫取食 2 种转基因杨树后其血淋巴 CAT 活力均显著高于对照。

2.2.3　对 POD 活性的影响：用 2 种转基因杨树饲喂杨小舟蛾幼虫后，前 36 h 内其血淋巴 POD 活力变化平缓，与对照组之间无显著差异，表明转基因杨树对杨小舟蛾幼虫血淋巴 POD 活力影响不大；处理 36 h 后，POD 活力逐渐上升，但低于对照，两者间差异不显著。因此，2 种转基因杨树对幼虫血淋巴 POD 活力影响不大（表 2）。

表 2　杨小舟蛾幼虫取食转基因杨树后血淋巴 SOD、CAT 和 POD 活性的变化

Table 2　The influence of transgenic poplars on the activity of SOD，CAT and POD in the haemolymph of *Micromelalopha troglodyta* larvae

取食时间 Feeding time（h）	SOD 活性 SOD activity（Unit·mg^{-1}·min^{-1}）			CAT 活性 CAT activity（mmol·mg^{-1}·min^{-1}）			POD 活性 POD activity（OD$_{470}$·mg^{-1}·min^{-1}）		
	CK	FB56	D18	CK	FB56	D18	CK	FB56	D18
4	4.511 ± 0.560	3.865 ± 1.138	4.981 ± 0.287	72.0 ± 10.0	72.4 ± 26.3	85.2 ± 32.1	0.658 ± 0.044	0.717 ± 0.029	0.774 ± 0.190
12	4.331 ± 0.862	4.054 ± 0.177	$3.458 \pm 0.129^{**}$	74.7 ± 10.0	$84.5 \pm 9.6^{*}$	$85.3 \pm 8.6^{*}$	0.800 ± 0.155	0.685 ± 0.161	0.706 ± 0.182
24	4.214 ± 0.697	4.263 ± 0.651	3.666 ± 1.032	67.7 ± 14.8	$87.2 \pm 9.0^{**}$	$82.5 \pm 5.6^{**}$	0.703 ± 0.071	$0.827 \pm 0.043^{**}$	$1.068 \pm 0.056^{**}$
36	5.598 ± 0.886	6.040 ± 2.294	6.425 ± 1.758	71.1 ± 8.1	$85.0 \pm 14.9^{*}$	64.0 ± 7.4	0.705 ± 0.025	0.667 ± 0.057	0.668 ± 0.144
48	3.129 ± 0.605	$5.481 \pm 0.586^{***}$	$6.321 \pm 2.853^{**}$	64.1 ± 10.4	$94.9 \pm 14.2^{***}$	$117.7 \pm 36.5^{***}$	1.479 ± 0.257	1.074 ± 0.360	0.851 ± 0.362

3　讨论

相关研究证实，昆虫体内 SOD 活性在外界刺激物的作用下多呈上升趋势，而 CAT 和 POD 活性不同程度地上升或下降。Peric-Mataruga 等（1997）和 Govenor 等（1997）研究证实舞毒蛾 *Lymantria dispar* 幼虫取食含有化感物质（allelochemicals）的槐树叶片后，其中肠 SOD 活力上升，CAT 活力下降；马志卿等（2004）用松油烯-4-醇处理 5 龄粘虫幼虫，4 个杀虫阶段试虫的 SOD 活性均极显著高于对照，CAT 和 POD 活性受到明显抑制；蒋继宏等（2005）用苦豆碱处理杨小舟蛾幼虫后，其体内 POD 和 CAT 活性在前期下降，而 SOD 活性在前期升高。本研究结果表明，杨小舟蛾幼虫取食转 *Bt* 单基因和转 *Bt + CpTI* 双价基因杨树叶片后，其中肠 SOD 活力显著上升，而 CAT 和 POD 活力受到了显著抑制，这与上述研究结果一致，但与 Ding 等（2001）的报道不完全相同，其原因可能是不同种类害虫对转基因杨树表达的杀虫蛋白等外界刺激物具有不同的应激反应。

SOD 能清除虫体内的 $O_2^{\cdot -}$ 生成 H_2O_2，H_2O_2 又能与 $O_2^{\cdot -}$ 形成毒性更强的 HO·，此时必须由 CAT 和 POD 来分解 H_2O_2，防止产生自由基毒害。杨小舟蛾取食转基因杨树叶片后，对毒蛋白作出类似于抗性的反应，导致其中肠 SOD 活力显著上升，机体内产生了大量的 H_2O_2，而此时 CAT 和 POD 活力又受到了显著抑制，造成体内清除自由基遇到了障碍。因此，转基因杨树叶片表达的杀虫蛋白在被害虫摄入后，可扰乱幼虫中肠 SOD、CAT 和 POD 三种保护酶的动态平衡，对虫体产生伤害作用。此外，转双价基因杨树对抑制杨小舟蛾幼虫中肠 SOD 活力上升的能力大于转单基因杨树，对 CAT 和 POD 活性的抑制能力也远远大于转单基因杨树。由此可见，用转双价基因杨树饲喂杨小舟蛾，因其中肠 SOD 活力上升而产生大量的 H_2O_2 得不到 CAT 和 POD 的分解，导致其自由基毒害大于转单基因杨树，这与作者对 2 种转基因杨树杀虫活性的生测结果是一致的（郭同斌等，2004）。

吴小锋等（1997，1998）用氟化物处理家蚕幼虫，其血淋巴 SOD 活力在初期上升，随后下降并低于对照，认为家蚕体内 SOD 活性与蚕的发育、变态及健康状况有密切关系；随后他们又研究认为家蚕血液 CAT 活力与其发育、变态、体内代谢均具有密切关系，逆境条件下 CAT 活力变化幅度的大小可以作为家蚕抗逆性的一个重要生理指标。本研究结果表明，用 2 种转基因杨树饲喂杨小舟蛾幼虫，其血淋巴的三种保护酶活性变化表现为类似的规律：处理组 SOD 前期活力较对照组下降，差异不显著，后期显著高于对照组；处理组 CAT 活力几乎全程高于对照组；转基因杨树对 POD 活力的影响较小。由此分

析，SOD 活力在前期小于对照，使机体内清除 $O_2^{\cdot -}$ 受到阻碍，但后期 SOD 活力恢复，CAT 活力升高及 POD 活性变化不大，虫体很快对这种清除 $O_2^{\cdot -}$ 的困难状态产生适应性。就相同时间进行的测定结果而言，转基因杨树对杨小舟蛾幼虫血淋巴保护酶系统的影响小于对中肠保护酶系统的影响。

参考文献（References）

Beauchamp CD，Fridovich I，1971. Superoxide dismutase：Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*，44：276－287.

Cheng LJ，Meng Z，1994. Molybdate colorimetric method for determination of catalase in serum. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*，12（1）：6－8.［程鲁京，孟泽，1994.钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶.临床检验杂志，12（1）：6－8］

Ding SY，Li HY，Li XF，Zhang ZY，2001. Effects of two kinds of transgenic poplar on protective enzymes system in the midgut of larvae of American white moth. *Journal of Forestry Research*，12（2）：119－122.

Fridovich I，1977. Oxygen is toxic！*Bioscience*，27（7）：462.

Gao HX，Li DF，Geng Z，Luan SW，Zhang P，1995. SAS System and Its Foundational Statistic Analysis. Beijing：Beijing University Press. 117－138.［高惠璇，李东风，耿直，栾世武，张平，1995. SAS 系统与基础统计分析.北京：北京大学出版社.117－138］

Govenor HL，Schultz JC，Appel HM，1997. Impact of dietary allelochemicals on Gypsy moth（*Lymantria dispar*）caterpillars：Importance of midgut alkalinity. *J. Insect Physiol.*，43（12）：1 169－1 175.

Guo TB，Ji BZ，Zhuge Q，Huang MR，2004. A study on the insect-resistance of transgenic poplars（NL-80106）carrying Bt genes to *Micromelalopha troglodyta*. *Journal of Nanjing Forestry University*，28（6）：5－9.［郭同斌，嵇保中，诸葛强，黄敏仁，2004.转 Bt 基因杨树（NL-80106）对杨小舟蛾抗虫性研究.南京林业大学学报，28（6）：5－9］

Jiang JH，Wu W，Cao XY，Guo TB，Chen FM，2005. Effects of aloperine on the activities of endogenous enzymes of protective system in the larva of *Micromelalopha troglodyta*. *Journal of Nanjing Forestry University*，29（5）：91－93.［蒋继宏，吴薇，曹小迎，郭同斌，陈凤美，2005.苦豆碱对杨小舟蛾体内保护酶系统活力的影响.南京林业大学学报，29（5）：91－93］

Jiang ZS，Shang ZZ，Wan SQ，Xu HH，Zhao SH，2003. ESR analysis of a photo-activated insecticide and its effects on superoxide dismutase，peroxidase and catalase activity in *Culex pipiens pallens*. *Acta Entomol. Sin.*，46（1）：22－26.［蒋志胜，尚稚珍，万树青，徐汉虹，赵善欢，2003.光活化杀虫剂 α-三噻吩的电子自旋共振分析及其对库蚊保护酶系统活性的影响.昆虫学报，46（1）：22－26］

Li ZZ，Shen HJ，Jiang QG，Ji BZ，1994. A study on the activities of endogenous enzymes of protective system in some insects. *Acta Entomol. Sin.*，37（4）：399－403.［李周直，沈惠娟，蒋巧根，嵇保中，1994.几种昆虫体内保护酶系统活力的研究.昆虫学报，37（4）：399－403］

Lozinskaya YL，Slepneva IA，Khramtsov VV，Glupov VV，2004. Changes of the antioxidant status and system of generation of free radicals in hemolymph of *Galleria mellonella* larvae at microsporidiosis. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*，40（2）：119－125.

Ma ZQ，Yan RL，Chen GQ，Li XM，Zhang X，2004. Effect of terpinen-4-ol on the activities of endogenous enzymes of protective system in armyworm（*Mythimna separata* Walker）. *Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry*，32（10）：85－88.［马志卿，颜瑞莉，陈根强，李喜梅，张兴，2004.松油烯-4-醇对粘虫体内保护酶活力的影响.西北农林科技大学学报，32（10）：85－88］

Peric-Mataruga V，Blagojevic D，Spasic MB，Ivanovic J，Jankovic-Hladni M，1997. Effect of the host plant on the antioxidative defence in the midgut of *Lymantria dispar* L. caterpillars of different population origins. *J. Insect Physiol.*，43（1）：101－106.

Simon LM，Fatrai Z，Jonas DE，Nathovies B，1974. Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgris*. *Biochem. Physiol.*，166：388－392.

Wang CB，2003. Quantitative analysis of proteins. In：Wang CB ed. Experimental Technology of Practical Biochemistry and Molecular Biology. Wuhan：Hubei Science and Technology Press. 202－204.［王淳本，2003.蛋白质的定量测定.见：王淳本主编.实用生物化学与分子生物学实验技术.武汉：湖北科学技术出版社.202－204］

Wang Y，Oberley LW，Murhammer DW，2001a. Antioxidant defense systems of two Lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*，30（11）：1 254－1 262.

Wang Y，Oberley LW，Murhammer DW，2001b. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two Lepidopteran insect cell lines. *Free Radical Biology and Medicine*，31（11）：1 448－1 455.

Wu XF，Xu JL，Cui WZ，1997. Factors affecting the activity of superoxide dismutase in haemolymph of the silkworm. *Acta Seric. Sin.*，23（1）：38－41.［吴小锋，徐俊良，崔为正，1997.家蚕血液超氧化物歧化酶活力及其影响因素.蚕业科学，23（1）：38－41］

Wu XF，Xu JL，Cui WZ，1998. The activity of catalase in haemolymph of the silkworm，*Bombyx mori*（L.）and its relation to larval resistance. *Acta Entomol. Sin.*，41（2）：124－129.［吴小锋，徐俊良，崔为正，1998.家蚕血液过氧化氢酶活力及其与蚕体抗逆性的关系.昆虫学报，41（2）：124－129］

（责任编辑：黄玲巧）